



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

Offenlegungsschrift

DE 198 15 864 A 1

(21) Aktenzeichen: 198 15 864.5
 (22) Anmeldetag: 8. 4. 98
 (43) Offenlegungstag: 14. 10. 99

(51) Int. Cl.⁶:
C 07 H 19/20

A 61 K 48/00
 A 61 K 31/70
 C 07 H 21/00
 C 12 P 19/34
 C 12 Q 1/68
 G 01 N 33/68
 G 01 N 27/62
 G 01 N 27/447
 G 01 N 33/52

(71) Anmelder:
 Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie
 (EMBL), 69117 Heidelberg, DE

(74) Vertreter:
 H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

(72) Erfinder:
 Faulstich, Konrad, 69117 Heidelberg, DE; Ansorge,
 Wilhelm, 69117 Heidelberg, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- (54) 5'-modifizierte Nukleotide und ihre Anwendung in der Molekularbiologie und Medizin
- (57) Die Erfindung betrifft 5'-modifizierte Nukleotide und diese Nukleotide enthaltende Nukleinsäuren. Weiterhin werden Verfahren zum Einbau der 5'-modifizierten Nukleotide in Nukleinsäuren und die anschließende ortspezifische Spaltung der Nukleinsäuren an den 5' modifizierten Monomerbausteinen offenbart. Diese Verfahren können zur Nukleinsäuresequenzierung, zur Erzeugung von Nukleinsäurebibliotheken, zum Nachweis von Mutationen, zur Herstellung trägergebundener Nukleinsäuren und für pharmazeutische Zwecke eingesetzt werden.

DE 198 15 864 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft 5'-modifizierte Nukleotide und diese Nukleotide enthaltende Nukleinsäuren. Weiterhin werden Verfahren zum Einbau der 5'-modifizierten Nukleotide in Nukleinsäuren und die anschließende ortsspezifische Spaltung der Nukleinsäuren an den 5'-modifizierten Monomerbausteinen offenbart. Diese Verfahren können zur Nukleinsäuresequenzierung, zur Erzeugung von Nukleinsäurebibliotheken, zum Nachweis von Mutationen, zur Herstellung trägegebundener Nukleinsäuren und für pharmazeutische Zwecke eingesetzt werden.

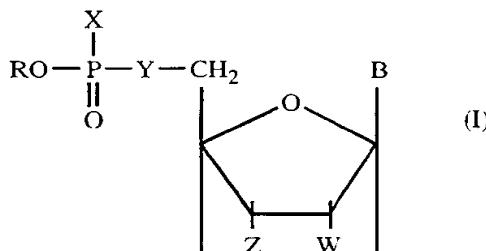
Die heute routinemäßig angewandten Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren beinhalten im allgemeinen die Polymerisation eines zu einer Matrize komplementären Nukleinsäurestrangs und die Erzeugung eines Gemisches an Nukleinsäurefragmenten mit allen möglichen Längen (1). Dieses Nukleinsäurefragmentgemisch kann durch Termination der Polymerisation oder Abbau durch Exonukleasen (2), iterative Sequenziermethoden (3), Zugabe einzelner Basen und Nachweis der Freisetzung von Pyrophosphat (4), chemische Methoden unter Verwendung von Eliminationsreaktionen (5), chemisch-enzymatische Methoden unter Einbau von modifizierten Nukleosiden und Spaltung durch Angriff auf Phosphorthioat- oder Bor-modifizierte Nukleotide (6), Einbau von Ribonukleosiden in DNA und anschließende Spaltung unter basischen Bedingungen (7) oder den Einbau von 3'-farbmarkierten Nukleotiden mit gleichzeitiger oder nachfolgender Abspaltung des Farbstoffs (8) erfolgen. Neben diesen Methoden stehen auch Strategien zur Verfügung, die eine Sequenzierung durch Hybridisierung (9) und eine physikalische Fragmenterzeugung durch Massenspektrometrie (10) beinhalten. Auch ein Nachweis durch Atomkraftmikroskopie (11) wurde diskutiert.

In den letzten zwanzig Jahren ist die Methode der Wahl jedoch die enzymatische Kettenabbruchmethode gewesen. Diese Methode ermöglicht eine Automatisierung und eine Sequenzierung mit hohem Durchsatz zur Anwendung bei der Sequenzierung ganzer Genome. Die Automatisierung würde durch Verwendung von Farbstoffprimern (12), interne Markierung (13) oder Farbstoffterminatoren (14) erreicht. Die Sequenzierung mit Farbstoffprimern und die interne Markierung haben jedoch den Nachteil, daß irreguläre Terminationsvorgänge in der Sequenzleiter auftreten und zur Fehlinterpretation der Sequenzdaten führen können. Farbstoffterminatoren haben den Nachteil, daß sie zum Teil an falschen Stellen eingebaut werden und nur eine begrenzte Ableselänge ermöglichen, da es sich bei ihnen um modifizierte Substrate handelt.

Darüber hinaus besteht ein Bedürfnis, die für eine Sequenzbestimmung benötigte DNA-Menge zu verringern. Hierzu steht derzeit nur eine einzige Zykensussequenzierungsmethode zur Verfügung (15), die jedoch im Gegensatz zu PCR, wo eine exponentielle Amplifikation stattfindet, nur zu einer linearen Amplifikation der Produkte führt. Die direkte Sequenzierung von PCR-Produkten weist wiederum Nachteile auf, da in den Reaktionsgefäßen größere Mengen an Triphosphaten und Primermolekülen vorliegen, die zu einer Beeinträchtigung der Sequenzierungsreaktion oder der Sequenzbestimmung führen können (16). Die Aufreinigung von PCR-Produkten ist jedoch zeitaufwendig und bedeutet einen zusätzlichen Verfahrensschritt. Zwar können Triphosphate durch enzymatische Methoden (17) gespalten werden, aber auch dies ist zeitaufwendig und erhöht die Kosten für die Durchführung der Sequenzierungsreaktion. Als Alternative steht ein direktes exponentielles Amplifikations- und Sequenzierverfahren (DEXAS) zur Sequenzierung geringer Mengen an DNA-Material zur Verfügung (18); dieses Verfahren konnte bisher jedoch nicht für eine Standardsequenzierung eingesetzt werden und ist im Gegensatz zu seinem Namen nicht direkt exponentiell.

Gemäß vorliegender Erfindung wird ein neues Nukleinsäuresequenzierungsverfahren bereitgestellt; bei dem die Nachteile des Standes der Technik mindestens teilweise vermieden werden. Durch dieses Verfahren wird insbesondere das Problem der Substratspezifität hinsichtlich Farbstoffterminatoren vermieden und es ermöglicht eine schnelle DNA-Sequenzierung unter Verwendung sehr geringer Mengen an DNA-Ausgangsmaterial in Kombination mit einer Nukleinsäureamplifikationsreaktion wie etwa PCR. Auch die lesbare Länge der sequenzierbaren Matrizen wird durch das Verfahren verbessert.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf der Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I):



worin:

B eine Nukleobase, d. h. eine natürliche oder nichtnatürliche zur Hybridisierung mit komplementären Nukleinsäuresträngen geeignete Base wie etwa A, C, G, T, U, I, 7-Deaza-G, 7-Deaza-A, 5-Methyl-C etc. bedeutet,

W und Z jeweils OR¹, SR¹, NiR¹₂ oder R¹ bedeuten, wobei R¹ jeweils unabhängig bei jedem Vorkommen Wasserstoff oder einen organischen Rest, z. B. einen Alkyl-, Alkenyl-, Hydroxyalkyl-, Amin-, Ester-, Acetal- oder Thioesterrest, vorzugsweise mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen und besonders bevorzugt mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen darstellt,

X OR², SR² oder B(R²)₂ bedeuten, wobei R² jeweils unabhängig Wasserstoff, ein Kation, z. B. ein Alkalimetall- oder Ammoniumion, oder einen organischen Rest, z. B. einen Farbstoff wie etwa Fluoresceine, Rhodamine, Cyanine und deren Derivate bedeutet,

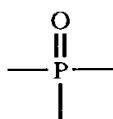
Y NR³ oder S, insbesondere NR³ bedeuten, wobei R³ Wasserstoff oder einen organischen Rest, z. B. einen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffrest, insbesondere einen C₁-C₄-Rest oder einen Farbstoffrest darstellt, wobei unter Wasserstoff auch die Isotopen Deuterium und Tritium zu verstehen sind, und

R Wasserstoff, ein Kation, einen organischen Rest oder eine gegebenenfalls modifizierte Phosphat- oder Diphosphat-

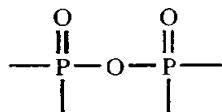
DE 198 15 864 A 1

gruppe, insbesondere eine Diphosphatgruppe bedeutet, zum Einbau in Nukleinsäuren und zur anschließenden ortsspezifischen Spaltung der Nukleinsäuren, vorzugsweise durch Hydrolyse der Bindung P-Y, wobei Nukleinsäurefragmente mit einem 5'-Ende HY-CH₂- entstehen.

Die Gruppe R kann einen organischen Rest bedeuten, beispielsweise einen lipophilen Rest, der das Binden der Substanz in eine Zelle erleichtert. Vorzugsweise ist R eine Phosphatgruppe:



oder eine Diphosphatgruppe:



Diese Phosphat- oder Diphosphatgruppe kann modifiziert sein. So können ein oder mehrere endständige Sauerstoffatome Substituenten tragen, z. B. organische Reste. Andererseits können ein oder mehrere endständige Sauerstoffatome und bei der Diphosphatgruppe auch das Brückensauerstoffatom durch Gruppen wie S, NR⁴ oder C(R³)₂ ausgetauscht sein, wobei R³ wie zuvor definiert ist. Darüber hinaus können auch 2 Substituenten an endständigen Sauerstoffatomen miteinander verbrückt sein.

Wenn Substituenten vorhanden sind, befinden sie sich vorzugsweise an Sauerstoffatomen des jeweils endständigen Phosphoratoms, besonders bevorzugt am γ-Phosphoratom. Beispiele für geeignete Substituenten sind organische Reste wie etwa Alkylreste, die selbst substituiert sein können, oder eine Salicylgruppe, die mit 2 Sauerstoffatomen des endständigen Phosphors einen 6gliedrigen cyclischen Diester bilden kann. Der aromatische Kern der Salicylgruppen kann wiederum selbst einen oder mehrere zusätzliche Substituenten tragen, z. B. solche wie für R¹ definiert oder Halogenatome. Weiterhin bevorzugte Substituenten am Sauerstoffatom sind Reste wie C₁-C₁₀-Alkyl, -(CH₂)_n-N₃, (CH₂)_nN(R³)₂ oder -(CH₂)_nNHCO(CH₂)_m-N(R³)₂, wobei n und m ganze Zahlen von 1 bis 8, vorzugsweise von 2 bis 5 sind und R³ wie zuvor definiert ist, aber außerdem vorzugsweise einen aromatischen Rest wie etwa Phenyl- oder Dinitrophenyl bedeuten kann.

Der Einbau von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) in Nukleinsäuren erfolgt vorzugsweise enzymatisch. Möglich ist jedoch auch eine chemische Synthese. Für einen enzymatischen Einbau werden vorzugsweise Enzyme verwendet ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus DNA-abhängigen DNA-Polymerasen, DNA-abhängigen RNA Polymerasen, RNA-abhängigen DNA Polymerasen, RNA-abhängigen RNA Polymerasen und terminalen Transferasen. Besonders bevorzugt ist die T7 DNA-Polymerase, verwandte Enzyme wie etwa die T3 oder die SP6 DNA Polymerase oder Modifikationen dieser Enzyme. Denentsprechend kann es sich bei den Nukleinsäuren, in die die Verbindungen der Formel (I) eingebaut werden, um DNAs oder/und RNAs handeln, die gegebenenfalls ein oder mehrere weitere modifizierte Nukleotidbausteine tragen können.

Nukleinsäuren, die als Monomerbausteine mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) enthalten, können an dem die P-Y-Bindung enthaltenden Nukleotidbaustein ortsspezifisch gespalten werden. Diese ortsspezifische Spaltung kann beispielsweise an der P-Y-Bindung selbst durch Temperaturerhöhung, z. B. auf mindestens 37°C, Einstellung saurer Bedingungen, z. B. pH ≤ 5, Mikrowellenbehandlung, Laserbehandlung, z. B. mit einem Infrarotlaser oder/und 3'-seitig des die P-Y-Bindung enthaltenden Nukleotids durch enzymatische Verdau, beispielsweise mit Exo- oder Endonukleasen oder Phosphodiesterasen, z. B. 3'→5'-Schlangengiftphosphodiesterase erfolgen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch in Kombination mit einer Anplifikationsreaktion, z. B. einer PCR, durchgeführt werden. Dies erlaubt die Verwendung von extrem geringen Mengen an DNA-Ausgangsmaterial zur Erzeugung markierter komplementärer Nukleinsäurestrände. Vorzugsweise wird die Nukleinsäureamplifikation mit thermostabilen Enzymen in mehreren Zyklen durchgeführt.

Der Einbau der Verbindungen gemäß (I) in die Nukleinsäuren kann in Lösung erfolgen. Alternativ kann der Einbau der Verbindungen jedoch auch in trägegebundene Nukleinsäuren erfolgen. Nach der Synthese kann dann eine Freisetzung der Nukleinsäuren vom Träger, gegebenenfalls durch die ortsspezifische Spaltung der P-Y-Bindung oder durch andere Methoden erfolgen.

Nach der ortsspezifischen Spaltung der Nukleinsäuren werden Nukleinsäurefragmente erzeugt, die vorzugsweise an ihrem 5'-Ende die Gruppe Y-CH₂- oder/und an ihrem 3'-Ende eine Phosphatgruppe aufweisen. Bisher mußten derart modifizierte Nukleinsäuren auf komplizierte Art und Weise durch chemische Synthese (19) oder durch enzymatische Reaktionen (20, 21) erzeugt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist wesentlich schneller, kostengünstiger und erlaubt eine einfachere Handhabung der Verbindungen. Die auf diese Weise hergestellten modifizierten Nukleinsäuren können für therapeutische Zwecke oder/und für molekularbiologische Untersuchungen, z. B. Untersuchungen von Mechanismen der Aufnahme und des Metabolismus von Nukleinsäuren in Zellen verwendet werden, da an die 5'-Y-Gruppe auf einfache Weise eine Markierungsgruppe gekoppelt werden kann. Die 3'-Phosphogruppe wiederum stellt eine Schutzgruppe gegen einen 3'→5'-Nukleaseabbau dar. Auch an das 3'-Ende der Nukleinsäurefragmente können sofern gewünscht

Markierungsgruppen angefügt werden, z. B. durch eine enzymatische Reaktion beispielsweise unter Verwendung terminaler Transferase und markierten Oligonukleotiden oder einer Polymerase und markierten Dideoxynukleosidtriphosphaten.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragmente aufgrund der definierten Gruppe an ihrem 5'-Ende auf einfache Weise auf einem Träger immobilisiert werden, der eine mit der Gruppe Y reaktive, funktionalisierte Ober-

DE 198 15 864 A 1

fläche enthält. Andererseits kann auch eine adsorptive Bindung über die Gruppe Y an eine Oberfläche erfolgen. Geeignete Träger sind solche, die Oberflächen beispielsweise aus Metall, Glas, Keramiken oder/und Kunststoff aufweisen. Besonders bevorzugt sind Träger mit Glas oder/und Siliciumoberflächen. Die Träger können weiterhin jede beliebige Form aufweisen, z. B. Mikropartikel wie etwa magnetische Mikropartikel oder Halbleitermaterialien wie Biochips, z. B. DNA- oder RNA-Chips, die gegebenenfalls mehrere mit Nukleinsäuren spezifisch bindende definierte Flächen in Form von Array-Anordnungen enthalten können.

Wenn bei der Spaltung der Nukleinsäuren ein heterogenes Nukleinsäuregemisch entsteht, kann dieses zur Herstellung einer Nukleinsäurebibliothek, insbesondere einer statistischen Bibliothek verwendet werden. Solche Bibliotheken können auch durch multiplen statistischen Einbau von Verbindungen der Formel (I) in einer Nukleinsäurestrang gefolgt von einer ortsspezifischen Spaltung erzeugt werden. Außerdem können zur Erzeugung statistischer Nukleinsäurebibliotheken auch degenerierte und statistisch an Nukleinsäurematrizen bindende Primer eingesetzt werden.

Die durch das erfundengemäße Verfahren erzeugten Nukleinsäurefragmente können nach der ortsspezifischen Spaltung einer Nachweisreaktion unterzogen werden. Diese Nachweisreaktion kann mit beliebigen, für diesen Zweck bekannten Methoden erfolgen. Vorzugsweise wird eine massenspektrometrische Analyse oder/und eine Elektrophorese, z. B. eine Polyacrylamideelektrophorese, durchgeführt.

Die Nachweisreaktion kann beispielsweise zum Nachweis von Mutationen, z. B. von Punktmutationen in Nukleinsäuren eingesetzt werden. Zwei Protokolle zur Analyse von Punktmutationen werden im folgenden ausführlich beschrieben.

Eine weitere wichtige Anwendung des erfundengemäßen Verfahrens ist die Nukleinsäuresequenzierung. Solche Sequenzierverfahren können in unterschiedlichen Varianten durchgeführt werden. Beispielsweise ist das erfundengemäße Verfahren auch für eine "Cycle"-Sequenzierung in Kombination mit einer Nukleinsäureamplifikation oder/und für eine bidirektionale Sequenzanalyse auf einem Nukleinsäurestrang geeignet. Bevorzugte Beispiele von Sequenzierverfahren werden im folgenden ausführlich beschrieben.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als wirksame Komponente eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) gegebenenfalls in Kombination mit pharmazeutisch verträglichen Träger-, Hilfs- oder/und Füllstoffen enthält. Darüber hinaus betrifft die Erfindung auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die als wirksame Komponente eine Nukleinsäure, in die mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) eingebaut ist, sowie gegebenenfalls pharmazeutisch verträgliche Träger-, Hilfs- oder/und Füllstoffe enthalten. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen sind als Mittel für die Gentherapie, als antivirale Mittel oder für Antisense-Anwendungen geeignet. So können Nuklease-resistente 5'-Aminoverbindungen oder diese Verbindungen enthaltende Nukleinsäuren in lebende Zellen eingebracht und dort von zellulären oder/und viralen Enzymen, z. B. Polymerasen oder Reverse Transkriptasen, in Nukleinsäuren eingebaut werden. Wenn die zelluläre Polymerase beispielsweise nicht in der Lage ist, die modifizierten Gene abzulesen und selbst die modifizierten Triphosphate als Substrate nicht akzeptiert, kann die virale genetische Information nicht amplifiziert werden. Weiterhin führt der Einsatz der 5'-modifizierten 5'-Nukleosidtriphosphate zu einer Zersetzung der viralen Gene, da die eingeführte P-Y-Bindung, insbesondere die P-N-Bindung unter physiologischen Bedingungen labil ist.

Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Nukleinsäurefragmenten umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Nukleinsäure, die mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) als monomeren Baustein enthält und
- 40 (b) ortsspezifisches Spalten der Nukleinsäure.

Erfundengemäße Verbindungen der Formel (I) können als Bestandteile von Reagenzienkits zum Nachweis von Nukleinsäuren, z. B. als Sequenzierungskits oder als Kits zur Mutationsanalyse gegebenenfalls mit weiteren Nachweiskomponenten verwendet werden. Diese weiteren Nachweiskomponenten sind beispielsweise Enzyme, insbesondere Polymerasen wie etwa DNA-Polymerasen oder Reverse Transkriptasen, als Primer verwendbare Oligonukleotide, die gegebenenfalls an ihrem 5'-Ende oder/und an ihrer Seitenkette eine Markierung tragen können, Deoxynukleosidtriphosphate, die gegebenenfalls eine Markierung tragen können, Dideoxynukleosidtriphosphate (Kettenabbruchmoleküle), die gegebenenfalls eine Markierung tragen können, sowie weitere Reagenzien, z. B. Puffer etc. und feste Träger. Vorzugsweise enthalten die erfundengemäßen Reagenzienkits die in den nachfolgenden Figuren angegebenen Bestandteile.

- 50 Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Figuren und Beispiele erläutert:
Es zeigen:
Fig. 1 die schematische Darstellung der Synthese 5'-Amino-modifizierter Nukleoside;
Fig. 2 die schematische Darstellung der Herstellung von 5'-Amino-modifizierten Nukleosidtriphosphaten;
Fig. 3 die schematische Darstellung der Erzeugung 5'-Amino-modifizierter oder/und 3'-phosphorylierter DNA-Fragmente durch ortsspezifische Spaltung der P-N-Bindung bei eingebauten 5'-Aminonukleosidtriphosphaten;
55 **Fig. 4** die schematische Darstellung einer selektiven 5'- oder 3'-Markierung von Nukleinsäurefragmente;
Fig. 5 die schematische Darstellung der Abspaltung von Nukleinsäuren von festen Trägern;
Fig. 6 die schematische Darstellung eines Sequenzierprotokolls unter Verwendung eines 5'-Farbstoff-markierten Sequenzierprimers;
- 60 **Fig. 7** ein alternatives Verfahren zur Erzeugung sequenzierbarer Fragmente durch Exonukleaseverdauung;
Fig. 8 die schematische Darstellung einer elektrophoresefreien iterativen Sequenziermethode;
Fig. 9 die schematische Darstellung einer bidirektionalen Sequenziermethode an einem einzigen Nukleinsäurestrang;
Fig. 10 die Markierung der Nukleinsäurefragmente nach der Sequenzierreaktion durch Terminal Transferase;
Fig. 11 eine erste Ausführungsform zum Nachweis von Punktmutationen;
- 65 **Fig. 12** eine zweite Ausführungsform zum Nachweis von Punktmutationen und
Fig. 13 die Erzeugung einer DNA Bibliothek.
Verfahren zur Herstellung von erfundengemäßen Verbindungen der Formel (I), worin Y eine Aminogruppe darstellt, sind in **Fig. 1a** und **b** gezeigt. **Fig. 1a** zeigt ein Schema zur Herstellung von 5'-Amino-2',5'-dideoxyparinnukleosiden.

DE 198 15 864 A 1

Hierzu werden die Aminogruppen der Nukleobase durch Reaktion mit Schutzgruppen blockiert, z. B. durch Silylierung mit Trimethylsilylchlorid und anschließende Einführung einer Bz- oder Ibu-Schutzgruppe. Dann wird die 5'-OH-Gruppe aktiviert, z. B. durch Umsetzung mit Tosylchlorid, so daß sie mit einem Alkalimetallazid, z. B. LiN₃, reagieren kann. Nach Abspaltung der Schutzgruppen, z. B. durch NH₃/MeOH, kann die Schutzgruppe reduktiv, z. B. mit H₂/PtO₂, in eine Aminogruppe überführt werden.

In Fig. 1b ist ein entsprechendes Syntheseschema zur Herstellung von 5'-Amino-2',5'-dideoxypyrimidinnukleosiden dargestellt. Thymidin kann beispielsweise direkt mit einem Azidsalz, z. B. NaN₃, umgesetzt und anschließend die Azidgruppe reduktiv in eine Aminogruppe überführt werden. Bei Cytidin wird zunächst die Nukleobase durch eine Schutzgruppe, z. B. Bz, blockiert und anschließend kann auf analoge Weise wie bei Thymidin eine Azidgruppe eingeführt werden, die reduktiv zu einer Aminogruppe umgesetzt werden kann.

In Fig. 2 ist ein Syntheseschema zur Herstellung von 5'-Amino-2',5'-dideoxynukleosid-5'-triphosphaten gezeigt, mit dem auf einfache Weise eine Triphosphatgruppe an die gemäß Fig. 1 erhaltenen Nukleoside angefügt werden kann. Die auf diese Weise hergestellten 5'-Aminonukleosidtriphosphate können als Monomerbausteine für den Einbau in Nukleinäuren verwendet werden.

Ausführliche Angaben zur Ausführung dieser Reaktionen finden sich in Beispiel 1.

Fig. 3 zeigt die Erzeugung von modifizierten DNA-Fragmenten, die einen 5'-Amino-T-Baustein enthalten und die anschließende Spaltung dieser DNA-Fragmente an der P-N-Bindung, wobei 3'-phosphorylierte oder/und 5'-Aminomodifizierte DNA-Fragmente erhalten werden.

Fig. 4 zeigt Beispiele für eine selektive 5'- und 3'-Markierung der durch die Spaltung erzeugten Nukleinsäurefragmente.

Fig. 5 zeigt die Synthese von 5'-Aminonukleotidbausteinen enthaltenen DNA-Molekülen an einen festen Träger und die anschließende Freisetzung 5'-Amino-modifizierter DNA-Fragmente durch Spaltung der P-N-Bindung.

Fig. 6 zeigt eine schematische Darstellung einer Ausführungsform des 5'-Aminosequenzierverfahrens. Gemäß der gezeigten Ausführungsform wird ein am 5'-Ende eine Markierungsgruppe tragender Primer verwendet, der durch enzymatische Polymerisation verlängert wird, wobei 5'-Aminomodifizierte Nukleotide an statistischen Positionen in den Nukleinsäurestrang eingebaut werden. Die modifizierten Nukleotide werden von DNA Polymerasen, z. B. von der T7 DNA Polymerase, als Substrate akzeptiert. Die P-N-Bindungen sind statistisch über den Nukleinsäurestrang verteilt und können auf einfache Weise, z. B. durch Pyrolyse, saure Bedingungen oder/und Mikrowellenbehandlung gespalten werden, wobei ein Gemisch an Nukleinsäurefragmenten entsteht. Jedes dieser Fragmente trägt an seinem 3'-Ende eine Phosphatgruppe, wodurch Mobilitätsänderungen bei einer Gelektrophorese vermieden werden. Bei Einbau von Verbindungen der Formel (I), bei denen X eine nachweisbare Gruppe, z. B. eine Farbstoffgruppe bedeutet, werden nach Spaltung Nukleinsäurefragmente erhalten, die an ihrem 3'-Nukleotid eine Markierung aufweisen.

Auch für eine "Cycle"-Sequenzierung können die modifizierten Nukleotide eingesetzt werden. Unter Verwendung thermostabiler Polymerasen ist es möglich, die DNA-Matrize beispielsweise durch PCR zunächst zu amplifizieren und dann die modifizierten Nukleotide bei 37°C mit T7 DNA Polymerase einzubauen. Die Spaltung erfolgt dann direkt im Reaktionsgefäß durch einfaches Erhitzen auf beispielsweise 95°C. Alternativ kann der Einbau der modifizierten Nukleotide schon während der Amplifikation selbst durch eine thermostabile Polymerase erfolgen.

Nach der Spaltung wird das Reaktionsgemisch oder ein Teil davon einer Nachweisreaktion, z. B. durch Gelektrophorese, unterzogen. Auf diese Weise werden Probleme hinsichtlich der Substratspezifität bei Farbstoff-markierten Kettenabbruchmolekülen vermieden. Verglichen mit bisher verfügbaren chemisch-enzymatischen Methoden, z. B. durch Einbau von α-Thionukleotiden, erlaubt das erfundungsgemäße Verfahren eine einfachere Spaltung der erzeugten Nukleinsäurestränge, ohne daß aggressive Chemikalien verwendet werden müssen, die die Markierungsgruppe des Primers bzw. die glykosidische Bindung angreifen könnten. Durch das erfundungsgemäße Verfahren können die Kosten von bestehenden Sequenzierprotokollen verringert werden, da die Triphosphate auf sehr einfache Weise, z. B. durch den Anwender selbst, direkt vor der Sequenzierung herstellbar sind. Das Verfahren ist schnell, einfach und funktioniert selbst mit einer sehr geringen Menge an DNA-Ausgangsmaterial.

Fig. 7 zeigt eine alternative Methode zur Erzeugung von sequenzierbaren Nukleinsäurefragmenten durch 3→5'-Exonukleaseverdau, z. B. durch Schlangengiftporphodiesterase.

Fig. 8 zeigt ein Beispiel für eine Elektrophorese- oder/und Gel-freie iterative Sequenziermethode. Dabei werden farbstoffmarkierte 5'-Amino-modifizierte Deoxy-nukleosidtriphosphate verwendet, wobei jedes Nukleotid eine unterschiedliche Markierungsgruppe trägt. Durch die DNA Polymerase wird ein einziges Farbstoff-markiertes Amino-modifiziertes Nukleosid an den Primer angefügt und anschließend spezifisch an der P-N-Bindung wieder abgespalten. Die Art des angelagerten Nukleotids kann durch die nachgewiesene Markierungsgruppe identifiziert werden. Anschließend kann das identifizierte Nukleotid in unmodifizierter Form durch die Polymerase angefügt und der zuvor beschriebene Sequenzierschritt wiederholt werden. Ein Mehrfacheinbau desselben Nukleotids kann durch die Intensität der Markierung, z. B. einer Fluoreszenzmarkierung, nachgewiesen werden.

Fig. 9 zeigt ein bidirektionales Sequenzierprotokoll innerhalb eines einzigen Nukleinsäurestrangs. Hierzu werden wie zuvor beschrieben 5'-Amino-markierte Nukleoside in Nukleinsäurestränge eingebaut. Die Termination der Elongation erfolgt durch Zugabe von Kettenabbruchmolekülen, z. B. ddNTPs. Durch Restriktionsspaltungen können dann definierte 3'-Enden der Nukleinsäurestränge erzeugt werden. Durch Zugabe eines mit einer zweiten Markierungsgruppe versehenen Kettenabbruchmoleküls, z. B. eines ddNTPs, und Terminaler Transferase werden Nukleinsäurestränge erhalten, die an ihren 5'- bzw. 3'-Ende jeweils zwei, vorzugsweise unterschiedliche Markierungsgruppen tragen. Nach Spaltung der P-N-Bindungen werden zwei Sätze von unterschiedlich markierten DNA-Fragmenten erhalten, die in einer einzigen Sequenzreaktion nebeneinander nachweisbar sind.

Fig. 10 zeigt eine 3'-terminale Einführung von Markierungsgruppen. Hierzu werden zunächst durch Polymerisation unter Verwendung von Aminotriphosphaten Nukleinsäurestränge hergestellt, die anschließend an der P-N-Bindung gespalten werden. Die resultierenden Nukleinsäurefragmente mit 3'-Phosphatgruppen werden dephosphoryliert und durch Zusatz einer Markierungsgruppe tragenden Kettenabbruchmoleküls, z. B. eines 5'-Amino-ddNTPs, und Terminaler

DE 198 15 864 A 1

Transferase markiert. Auf diese Weise kann eine Sequenzierungreaktion in Abwesenheit jeglicher Art von Markierungsgruppen durchgeführt werden. Der Einbau der Markierungsgruppen in die zu sequenzierenden DNA Fragmente erfolgt erst nach Abschluß der Sequenzierungsreaktion. So werden Probleme hinsichtlich der Substratspezifität von Polymerasen vermieden und eine Verringerung der Kosten erreicht, da die Verwendung markierter Primermoleküle überflüssig wird.

Fig. 11 zeigt eine erste Ausführungsform zum Nachweis von Punktmutationen. Dabei wird ein Nukleinsäureprimer verwendet, dessen 3'-Ende sich unmittelbar "stromaufwärts" der potentiellen Mutationsstelle befindet. Durch Zugabe eines mit einer Markierungsgruppe versehenen 5'-Amino-modifizierten Nukleosidtriphosphats in Gegenwart einer Polymerase erfolgt eine Elongation des Primers um mindestens ein Nukleotid, sofern auf dem Matrizenstrang das zu dem jeweils verwendeten modifizierten Nukleosidtriphosphat komplementäre Nukleotid vorliegt. Der Einbau des Amino-modifizierten markierten Nukleotids in den DNA-Strang oder das Ausbleiben dieses Einbaus läßt sich auf einfache Weise durch bekannte Methoden nachweisen. Hierzu kann das nichteingebaute Nukleotid z. B. durch Zentrifugation oder - bei Bindung an eine Festphase - durch Waschen entfernt und dann der Nachweis der Markierung in an den Primer gebundener Form oder/und nach Abspaltung erfolgen.

Fig. 12 zeigt eine weitere Ausführungsform zum Nachweis von Punktmutationen. Hierzu wird ein trägegebundener Primer verwendet, der eine interne Markierungsgruppe trägt. Dann werden 5'-Amino-modifiziertes Nukleosidtriphosphat und Polymerase zugegeben. Bei Vorliegen einer bestimmten Nukleobase auf dem Matrizenstrang erfolgt eine Elongation des Primers, ansonsten wird kein 5'-Aminonukleosidtriphosphat an den Primer angefügt. Der Reaktionsansatz wird anschließend mit einer 3'→5'-Exonuklease behandelt. Nach Anfügen des 5'-Amino-modifizierten Nukleotids an den Primer findet aufgrund der P-N-Bindung kein enzymatischer Abbau durch die Exonuklease statt und die im Primer eingegebene Markierungsgruppe bleibt am festen Träger immobilisiert. Wenn hingegen kein 5'-Amino-modifiziertes Nukleosidtriphosphat an den Primer angefügt wird, wird dieser durch die Exonuklease abgebaut und die Markierung vom festen Träger abgespalten. Das Verbleiben der Markierung am Träger oder deren Freisetzung kann ohne weiteres durch bekannte Methoden nachgewiesen werden.

Fig. 13 zeigt die Erzeugung einer DNA-Bibliothek durch multiplen 5'-Aminodeoxynukleosidtriphosphat-Einbau in DNA Fragmente. Durch Spaltung der P-N-Bindungen wird eine Vielzahl unterschiedlicher DNA Fragmente erzeugt, die entweder an einen Träger gebunden werden können oder beispielsweise durch Massenspektrometrie analysiert werden können.

Beispiele

30

1. Synthese von modifizierten Nukleosiden

Die Synthese modifizierter Nukleoside wurde in Anlehnung an Mag et al (25) durchgeführt. 5'-Amino-5'-deoxythymidin-5'-triphosphat und 5'-Amino-2',5'-dideoxycytidin-5'-triphosphat wurden gemäß Yamamoto et al (26) mittels Substitution der 5'-Hydroxylgruppe durch eine Azidgruppe gefolgt von katalytischer Reduktion zum entsprechenden Amin synthetisiert. Die entsprechenden Guanosin- und Adenosin-Derivate wurden durch Tosylierung der 5'-Hydroxylgruppe und Substitution der Tosylgruppe mit Lithiumazid hergestellt, um N¹-C⁵-Cyclisierungsreaktionen zu verhindern. Die Purin-Azidverbindungen wurden ebenfalls durch katalytische Hydrierung reduziert. Nach Schutzgruppenabspaltung wurden die Nukleoside gemäß der von Letsinger et al (27) beschriebenen Methode mit Trinatriumtrimetaphosphat triphosphoryliert.

1.1 N⁴-Benzoyl-2'-deoxycytidin

1 Äquivalent 2'-Deoxycytidin wurde in wasserfreiem Pyridin gelöst. Hierzu wurden 5 Äquivalente Trimethylchlorsilan bei Raumtemperatur gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min gerührt, auf 0°C abgekühlt und tropfenweise mit 1,2 Äquivalenten Benzoylchlorid versetzt. Das Gemisch wurde erst 30 min und dann weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml kaltem Wasser bei 0°C gestoppt. Nach 20 min wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Der verbleibende Rückstand in heißem Wasser gelöst und dreimal mit Ethylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wurde auf 4°C abgekühlt und die resultierenden Kristalle durch Filtration und Waschen mit kaltem Wasser gewonnen. Das Produkt wurde bei 50°C über P₂O₅ unter Vakuum auf konstantes Gewicht getrocknet.

N⁴-benzoyl-2'-deoxyadenosin und N²-Isobuturyl-2'-deoxyguanosin wurden nach der gleichen Vorschrift hergestellt.

1.2 5'-Azido-5'-deoxythymidin

55

7,26 g (30 mmol) Thymidin, 9,45 g (36 mmol) Triphenylphosphin, 5,85 g (90 mmol) Natriumazid und 11,94 g (36 mmol) Tetra brommethan wurden in 120 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde mit 150 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und die wässrige Phase wurde mit viermal 200 ml Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch Silicagelchromatographie mit einem Gradienten von 0 bis 10% Methanol in Dichlormethan gereinigt. Die Ausbeute war etwa 76% (6,09 g).

Analyse:

DC: R_f 0,40 (Chloroform: Methanol = 9 : 1; Silicagel 60, F₂₅₄, Merck)

IR: V_{as}(N₂) = 2093,7 cm⁻¹ (s, KBr)

65 NMR: δ-¹H [ppm], 270 MHz, 300 K, DMSO-d₆:

11,30 (s, 1H, N¹H); 7,47 (s, 1H, H^{6'}); 6,18 (t, 1H, H^{2'}); 5,39 (d, 1H, O¹H);
4,22 (m, 1H, H^{3'}); 3,85 (m, 1H, H^{4'}); 3,55 (d, 2H, H^{5'}); 2,29 (m, 1H, H^{2''});
2,08 (m, 1H, H^{3''}); 1,79 (d, 3H, C⁵-CH₃).

DE 198 15 864 A 1

Elementaranalyse:

berechnet:

C: 44,94%; H: 4,90%; N: 26,21%

gefunden:

C: 44,77%; H: 4,86%; N: 25,93%.

5'-Azido-N⁴-benzoyl-2',5'-dideoxycytidin wurde nach der gleichen Vorschrift hergestellt.

1.3 5'-Azido-2',5'-dideoxycytidin

5'-Azido-N⁴-benzoyl-2',5'-dideoxycytidin wurde in einer gesättigten Lösung von Ammoniak in Methanol gelöst und bei Raumtemperatur für 12 h gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der Rückstand chromatographisch unter Verwendung von Dichlormethan mit einem Gradienten von 0 bis 15% Methanol als Elutionsmittel gereinigt.

1.4 5'-O-(4-Methylbenzolsulfon)-N⁶-benzoyl-2'-deoxyadenosin und 5'-O-(4-Methylbenzolsulfon)-N²-isobutyryl-2'-deoxyguanosin

Jeweils 1 Äquivalent N⁶-Benzoyl-2'-deoxyadenosin und N²-Isobutyryl-2'-deoxyguanosin wurden in trockenem Pyridin gelöst. Dazu wurden bei Raumtemperatur 3 Äquivalente 4-Methylbenzolsulfonylechlorid gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 45 min gerührt, dann auf Eis gekühlt und mit 5 ml Wasser abgeschreckt. Nach 15 min wurde die Lösung eingedampft und der ölige Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wurde zweimal mit 5% NaHCO₃, Wasser und gesättigter Salzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde chromatographisch unter Verwendung eines Gradienten von 0 bis 10% Methanol in Dichlormethan als Elutionsmittel gereinigt.

1.5 5'-Azido-2',5'-dideoxyadenosin und 5'-Azido-2',5'-dideoxyguanosin

Jeweils 1 Äquivalent der in Beispiel 1.4 hergestellten Verbindungen wurde in trockenem N,N-Dimethylformamid aufgenommen und mit fünf Äquivalenten Lithiumazid versetzt. Die Lösung wurde für 5 h bei 50°C gerührt. Dann wurde das fünffache Volumen an Dichlormethan zugesetzt und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Die Schutzgruppenabspaltung und Reinigung der Rohprodukte erfolgte wie bei der Herstellung von 5'-Azido-2',5'-dideoxycytidin beschrieben.

1.6. 5'-Amino-5'-deoxythymidin

150 ml absoluter Methanol wurden durch fünfmaliges Einfrieren und Auftauen unter Vakuum entgast. Darin wurden 1,5 g (5,62 nmol) 5'-Azido-5'-deoxythymidin gelöst und eine geringe Menge an Platin(IV)-Hydrat-Katalysator zugesetzt. Wasserdampfsgas wurde in die Lösung eingeleitet und das Gemisch wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration durch Cellite wurde das Lösungsmittel entfernt. Eine weitere Aufreinigung war nicht erforderlich. Die Ausbeute war nahezu quantitativ.

Analyse:

DC: R_f: 0,05 (Dichlormethan : Methanol = 9 : 1; Silicagel 60 F₂₅₄, Merck)

IR: V_{as} (N₂) = nicht vorhanden (KBr)

NMR: δ [ppm], 270 MHz, 300 K, DMSO-d₆:

7,63 (s, 1H, H⁶); 6,15 (t, 1H, H^{5'}); 5,15 (d, 1H, O^{2'}H); 4,21 (m, 1H, H^{3'});
3,65 (m, 1H, H^{4'}); 2,73 (d, 2H, H^{2'}, H^{5'}); 1,95–2,15 (m, 2H, H^{2'}, H^{3'}); 1,79 (d, 3H, C^{5'}-CH₃).

Massenspektrometrie: ESI (+)

berechnet:

242,2 Da;

gefunden:

242,1 Da.

5'-Amino-2',5'-dideoxycytidin, 5'-Amino-2',5'-dideoxyadenosin und 5'-Amino-2',5'-dideoxyguanosin wurden nach der gleichen Vorschrift hergestellt.

1.7 5'-Amino-5'-deoxythymidin-5'-triphosphat

2 mg (1 Äquivalent) 5'-Amino-5'-deoxythymidin und 13,4 mg (5 Äquivalente) Trinatriumtrimetaphosphat wurden in 100 µl sterilem Wasser (pH 8,50) aufgelöst, 30 h bei Raumtemperatur gerührt und dann bei -80°C aufbewahrt. Für die Sequenzierungsexperimente wurde ein Aliquot direkt ohne weitere Reinigung aus dem Reaktionsgemisch entnommen.

5'-Amino-2',5'-dideoxycytidin-5'-triphosphat, 5'-Amino-2',5'-dideoxyadenosin-5'-triphosphat und 5'-Amino-2',5'-dideoxyguanosin-5'-triphosphat wurden nach der gleichen Synthesevorschrift hergestellt.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 198 15 864 A 1

Analyse

Massenspektrometrie: ESI (-):

5'-Amino-2',5'-dideoxyadenosin-5'-triphosphat:

- 5 berechnet:
490,199 Da;
gefunden:
488,8 Da (M-H);
510,9 Da (M-2H+Na);
10 532,7 Da (M-2H+2Na).

5'-Amino-2',5'-dideoxycytidin-5'-triphosphat:

- berechnet:
466,173 Da;
15 gefunden:
464,8 Da (M-H);
486,8 Da (M-2H+Na).

5'-Amino-2',5'-dideoxyguanosin-5'-triphosphat:

- 20 berechnet:
506,198 Da;
gefunden:
504,8 Da (M-H);
526,8 Da (M-2H+Na);
25 548,7 Da (M-3H+2Na).

5'-Amino-5'-deoxythymidin-5'-triphosphat:

- berechnet:
481,184 Da;
30 gefunden:
479,9 Da (M-H);
480,6 Da (M);
501,8 Da (M-2H+Na);
523,8 Da (M-3H+2Na).

35

2. Sequenzierungsreaktion

Die Durchführung der Sequenzierungsreaktion ist am Beispiel der T-Spur dargestellt. Die Sequenzierungsreaktion für die A-, C- und G-Spuren kann auf analoge Weise erfolgen werden.

- 40 Pro Ansatz wurden 0,3 µl Primer, z. B. Universal- oder Reverseprimer (Fluoresceinisothiocyanat-markiert; 2 µM), 0,3 µl DMSO, 1,2 µl ss-M13 MP18 (+) DNA und 0,6 µl Annealingpuffer (1 M Tris-HCl pH 7,6; 100 mM MgCl₂) zusammengegeben. Die Lösung wurde 3 min bei 70°C inkubiert und über eine Zeitdauer von 20 min auf Raumtemperatur abgekühlt.

- 45 Zu dieser Lösung wurden 0,60 µl einer dNTP-Mischung (jeweils 250 µM dATP, dCTP und dGTP sowie 50 µM dTTP), 0,44 µl 5'-Amino-dTTP (aus der Reaktionsmischung von Beispiel 1.7) und 0,25 µl T7 Polymerase (8 U/ml) zugegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. Für die A-, C- und G-Spuren wurden entsprechend 5'-Amino-dATP, 5'-Amino-dCTP oder 5'-Amino-dGTP verwendet.

- 50 Anschließend werden 4 µl Stoplösung (95% deionisiertes Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% Xylenecyanol; 0,05% Bromphenolblau) zugegeben.

- 55 Zur Herstellung eines sequenzierbaren Gemisches an Nukleinsäurefragmenten wurden die P-N-Bindungen gespalten. Hierzu stehen folgende alternative Methoden zur Verfügung:

1. Spaltung durch Temperaturerhöhung:

40 minütiges Erwärmen auf 95°C (auch 20minütiges Erwärmen ist möglich).

- 55 2. Spaltung unter sauren Bedingungen:

Zugeben von 2 bis 5 µl 1 N HCl, fünfminütiges Inkubieren bei Raumtemperatur, Neutralisieren mit 2 bis 5 µl 1 N NaOH, fünfninütiges Denaturieren bei 95°C.

3. Spaltung durch Mikrowellen:

Behandeln der Probe mit Mikrowellenstrahlung für 30 min bei 900 W.

60

Alternativ hierzu können auch enzymatische Spaltungsmethoden durch Exo- bzw. Endonukleasen, insbesondere durch 3'→5'-Exonukleasen wie etwa 3'→5'-Schlangengiftphosphodiesterase verwendet werden. Hierzu werden 10 mU (3,2 µl) 3'→5'-Schlangengiftphosphodiesterase zugegeben, für 10 min 40°C inkubiert und für 5 min bei 95°C denaturiert.

- 65 Anschließend wurde das Fragmentgemisch analysiert, z. B. durch Polyacrylamidgelektrophorese. Hierzu wurden 5 µl des Reaktionsansatzes auf das Gel geladen. Alternativ kann der Reaktionsansatz bei -20°C aufbewahrt und dann vor dem Auftragen auf das Gel für 3 min bei 95°C denaturiert werden.

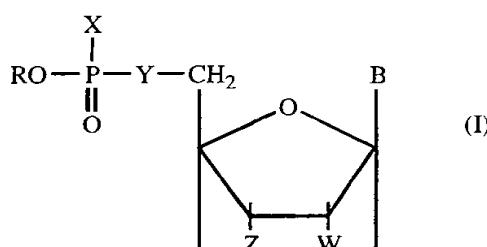
DE 198 15 864 A 1

Literaturverzeichnis

- (1) Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467, 1977.
- (2) Pieles, U., Zürcher, W., Schär, M., Moser, H. E., Nucl. Acids Res. 21, 3191-3196, 1993.
- (3) a) Jones, D. L., Bio Techniques, 22, 938-946, 1997.
b) Brenner, S., WO 95/27080, 1995.
- (4) Ronaghi, M., Kharanchouhani, S., Pettersson, B., Uhlén, M., Nyren, P., Anal. Biochem. 242, 84-89, 1996.
- (5) Maxam, A. M., Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560-564, 1977.
- (6) a) Clish, G., Eckstein, F., Science, 240, 1520-1522, 1988.
b) Nakayanie, K. L., Clish, G., Eckstein, F., Vosberg, H.-P., Nucl. Acids Res. 16, 9947-9959, 1988.
c) Labey, S., Lehrach, H., Goody, R. S., DNA 5, 173-177, 1986.
- (7) a) Barnes, W. M., J. Mol. Biol. 119, 83-99, 1978.
b) Hamilton, R. T., Wu, R., J. Biol. Chem. 249, 2466-2472, 1974.
- (8) a) Canard, B., Sarfati, R. S., Gene 148, 1-6, 1994.
b) Canard, B., Sarfati, S., PCT Int. Appl. WO 94 23064; PCT/FR94/00345, 1994.
- (9) a) Dramane, R., Labat, I., Bruckner, I., Crkvenjakov, R., Geonomics 4, 114-128, 1989.
b) Dramane, R., Dramane, S., Stroszka, Z., Paunesku, T., Labat, I., Zeremski, M., Snoddy, J., Funkhouser, W. K., Koop, B., Hood, L., Crkvenjakov, R., Science 260, 1649-1652, 1993.
c) Bains, W., Smith, G. C., J. Theor. Biol. 135, 303-307, 1988.
- (10) a) Baldwin, M. A., Natural Products reports. 33-44, 1995; b) Wolter, M. A., Engels, J. W., Eur. Mass Spectrom. 1, 583-590, 1995 c) Nordhoff, E., Karas, M., Cramer, R., Hahner, S., Hillenkamp, F., Kirpekar, F., Lezius, A., Muth, J., Meier, C., Engels, J. W., J. Mass Spectrom. 30, 99-112, 1995; d) Little, D. P., Chorush, R. A., Speir, J. P., Senko, M. W., Kelleher, N. L., McLafferty, F. W., J. Am. Chem. Soc. 116, 4893-4897, 1994; e) Grotjahn, L., Frank, R., Blöcker, H., Nucl. Acids Res. 10, 4671-4678, 1983.
- (11) Löber, G., Kitter, L., Phizier, 27, 113-117, 1996.
- (12) a) Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C., J. Biochem. Biophys. Meth. 13, 315-323, 1986; b) Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., Heiner, C., Kent, S. B. H., Hood, L. E., Nature 321, 674-679, 1986.
- (13) Voss, H., Schwager, C., Wirkner, U., Zimmermann, J., Erflle, H., Hewitt, N. A., Rupp, T., Stegemann, J., Ansorge, W., Meth. Mol. Cell. Biol. 3, 30-34, 1992.
- (14) Lee, L. G., Connell, C. R., Woo, S. L., Cheng, R. D., McArdle, B. E., Fuller, C. W., Halloran, N. D., Wilson, R., Nucl. Acids Res. 20, 2471-2483, 1992.
- (15) Murray, V., Nucl. Acids Res. 17, 8889, 1989.
- (16) Rosenthal, A., Coutelle, O., Craxton, M., Nucl. Acids Res. 21, 173-174, 1993.
- (17) Amersham Life Science product catalogue 1996, 89.
- (18) Kilger, C., Pääbo, S., Biol. Chem. 378, 99-105, 1997.
- (19) Smith, L. M., Fung, S., Hunkapillar, T. J., Hood, L. E., Nucl. Acids Res. 13, 2399-2412, 1985.
- (20) Current protocols in Molecular Biology, Vol 1, Section 3.10, John Wiley and Sons, Series Editor: Virginia Benson Chanda.
- (21) Bruick, R. K., Koppitz, M., Joyce, G. F., Orgel, L. E., Nucl. Acids Res. 25, 1309-1310, 1997.
- (22) Biomagnetic Techniques in Molecular Biology, Technical Hand book, second edition, Dynal, Oslo, Norway, 156-157.
- (23) Landegren, U., Laboratory protocols for mutation detection, Oxford University Press, 1996, ISBN 0-19-857795-8.
- (24) Nikiforov, T. T., Rendle, R. B., Goelet, B., Rogers, Y.-H., Kotewicz, M., L., Anderson, S., Trainor, G., L., Knapp, M. R., Genetic Bit Analysis: a solid phase method for typing single nucleotide polymorphisms, Nucl. Acids Res. 22, 4167-4175, 1994.
- (24a) Alexandrova, L. A., Skoblov, A. Y., Jasko, M. V., Victorova, L. S., Krayevsky, A. A., Nucl. Acids Res. 26, 778-786, 1998.
- (25) Mag M., Engels, J. W., Nucl. Acids Res. 17, 5973-5988, 1989.
- (26) Yamamoto, I., Sekine, M., Hata, T., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 1, 306-310, 1980.
- (27) Letsinger, R. L., Wilkes, J. S., Dumas, L. B., J. Am. Chem. Soc., 292-293, 1972.

Patentansprüche

1. Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I):



worin:

DE 198 15 864 A 1

B eine Nukleobase bedeutet,

W und Z jeweils OR¹, SR¹, NR¹₂ oder R¹ bedeuten,

wobei R¹ jeweils unabhängig bei jedem Vorkommen Wasserstoff oder einen organischen Rest darstellt,

X OR², SR² oder Br(R²)₂ bedeutet,

wobei R² jeweils unabhängig Wasserstoff, ein Kation oder einen organischen Rest bedeutet,

Y NR³ oder S bedeutet, wobei R³ Wasserstoff oder einen organischen Rest darstellt und

R Wasserstoff, ein Kation, einen organischen Rest oder eine gegebenenfalls modifizierte Phosphat- oder Diphosphatgruppe bedeutet.

zum Einbau in Nukleinsäuren und zur anschließenden ortsspezifischen Spaltung der Nukleinsäuren.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Einbau enzymatisch erfolgt.

3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus DNA-abhängigen DNA Polymerasen, DNA-abhängigen RNA Polymerasen, RNA-abhängigen DNA Polymerasen, RNA-abhängigen RNA Polymerasen und Terminalen Transferasen.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die ortsspezifische Spaltung erfolgt durch:

- (i) Temperaturerhöhung,
- (ii) Einstellen saurer Bedingungen,
- (iii) Mikrowellenbehandlung,
- (iv) Laserbehandlung oder/und
- (v) enzymatischem Verdau.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Einbau der Verbindungen in Kombination mit einer Nukleinsäureamplifikationsreaktion erfolgt.

6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäureamplifikation eine PCR umfaßt.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Einbau der Verbindungen in tragergebundene Nukleinsäuren erfolgt.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß in die durch Spaltung entstehenden Nukleinsäurefragmente eine oder mehrere Markierungsgruppen eingebaut werden.

9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß Markierungsgruppen am 5'- oder/und 3'-Ende der Nukleinsäurefragmente angefügt werden.

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die durch Spaltung entstehenden Nukleinsäurefragmente auf einem Träger immobilisiert werden.

11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger eine Oberfläche aus Metall, Glas, Keramik, oder/und Kunststoff aufweist.

12. Verwendung nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger aus Mikropartikel und Biochips ausgewählt wird.

13. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Spaltung eine Nukleinsäurebibliothek erzeugt wird.

14. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die durch Spaltung entstehenden Nukleinsäurefragmente einer Nachweisreaktion unterzogen werden.

15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Nachweisreaktion eine massenspektrometrische Analyse umfaßt.

16. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Nachweisreaktion eine Elektrophorese umfaßt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Nachweisreaktion eine Sequenzbestimmung umfaßt.

18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenzbestimmung eine Zyklussequenzierung in Kombination mit einer Nukleinsäureamplifikation umfaßt.

19. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenzbestimmung bidirektional auf einem Nukleinsäurestrang erfolgt.

20. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die durch Spaltung entstehenden Nukleinsäurefragmente für den Nachweis von Mutationen eingesetzt werden.

21. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als wirksame Komponente eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) wie in Anspruch 1 definiert enthält.

22. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als wirksame Komponente eine Nukleinsäure enthält, in die eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) wie in Anspruch 1 definiert eingebaut ist.

23. Verwendung der Zusammensetzung nach Anspruch 21 oder 22 zur Herstellung eines Mittels für die Gentherapie.

24. Verwendung der Zusammensetzung nach Anspruch 21 oder 22 zur Herstellung eines antiviralen Mittels.

25. Verfahren zur Herstellung von Nukleinsäurefragmenten umfassend die Schritte:

(a) Bereitstellen einer Nukleinsäure, die als monomeren Baustein mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) enthält, und

(b) ortsspezifisches Spalten der Nukleinsäure.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die durch Spaltung entstehenden Nukleinsäurefragmente am 5'-Ende die Gruppe HY-CH₂- aufweisen, wobei Y wie in Anspruch 1 definiert ist.

27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäurefragmente am 3'-Ende eine Phosphatgruppe aufweisen.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 27, weiterhin umfassend den Schritt:

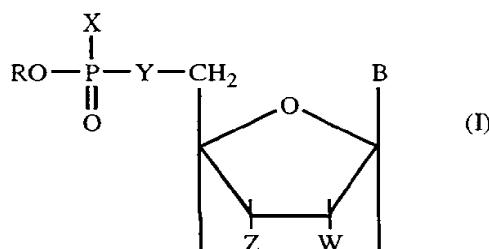
(c) Unterziehen der Nukleinsäurefragmente einer Nachweisreaktion.

DE 198 15 864 A 1

29. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie am 5'-Ende die Gruppe HY-CH₂- aufweist, wobei Y wie in Anspruch 1 definiert ist.

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß sie am 3'-Ende eine Phosphatgruppe aufweist.

31. Verbindung der allgemeinen Formel (I):



worin:

B eine Nukleobase bedeutet,

W und Z jeweils OR¹, SR¹, N(R¹)₂ oder R¹ bedeuten,

wobei R¹ jeweils unabhängig bei jedem Vorkommen Wasserstoff oder einen organischen Rest darstellt,

X OR², SR² oder B(R²)₃ bedeutet,

wobei R² jeweils unabhängig Wasserstoff, ein Kation oder einen organischen Rest bedeutet,

Y NR³ oder S bedeutet, wobei R³ Wasserstoff oder einen organischen Rest darstellt und

R Wasserstoff, ein Kation oder eine gegebenenfalls modifizierte Phosphat- oder Diphosphatgruppe bedeutet.

32. Reagenzienkit zum Nachweis von Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) wie in Anspruch 1 definiert zusammen mit weiteren Nachweiskomponenten enthält.

Hierzu 13 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

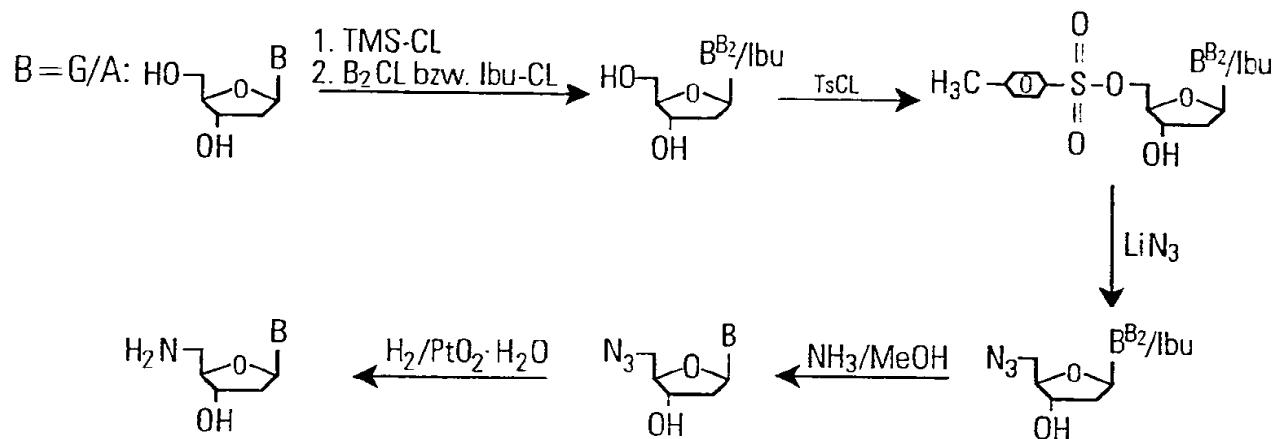
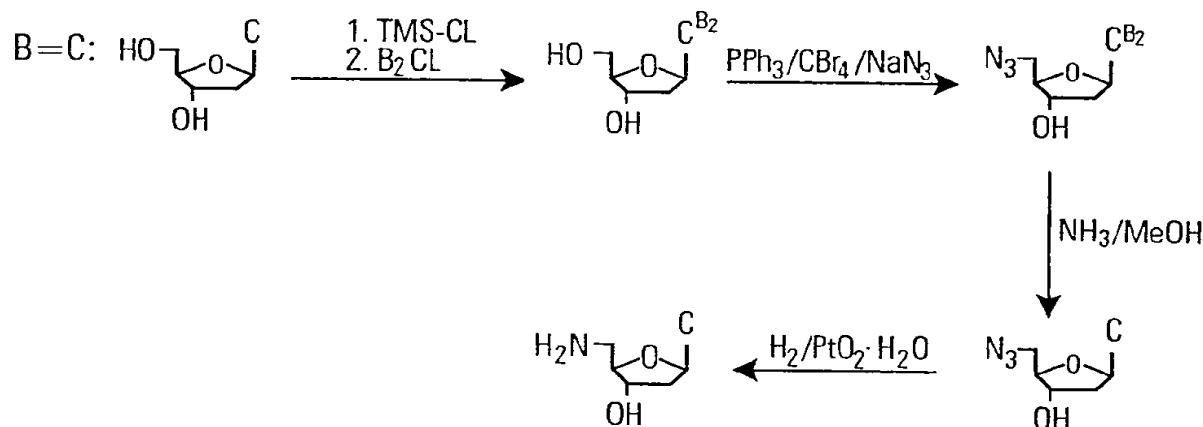
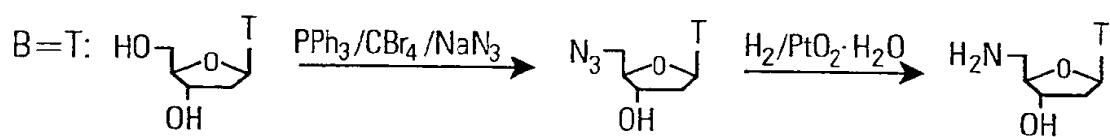
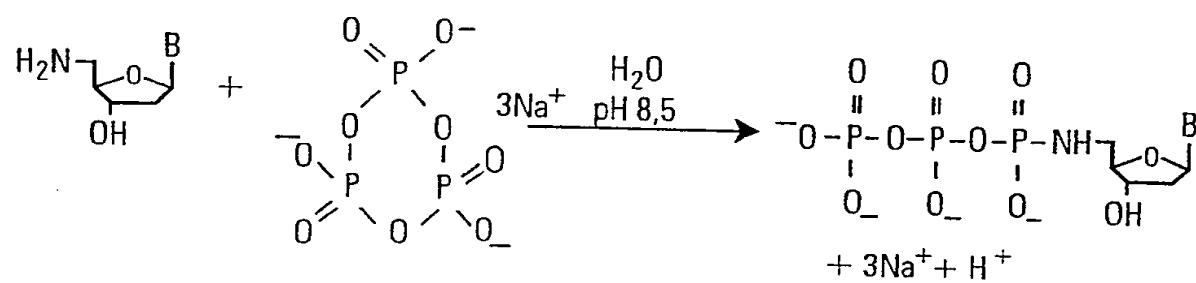
FIG.1**A****B** $TMS = (CH_3)_3Si -$ $Ibu = CH_3 - \begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ O \end{array}$ $B_2 = \text{C}(=O) \text{C}(=O)$ $PPh_3 = (C_6H_5)_3P$

FIG.2

$\text{B} = \text{A}, \text{C}, \text{G}, \text{T}$

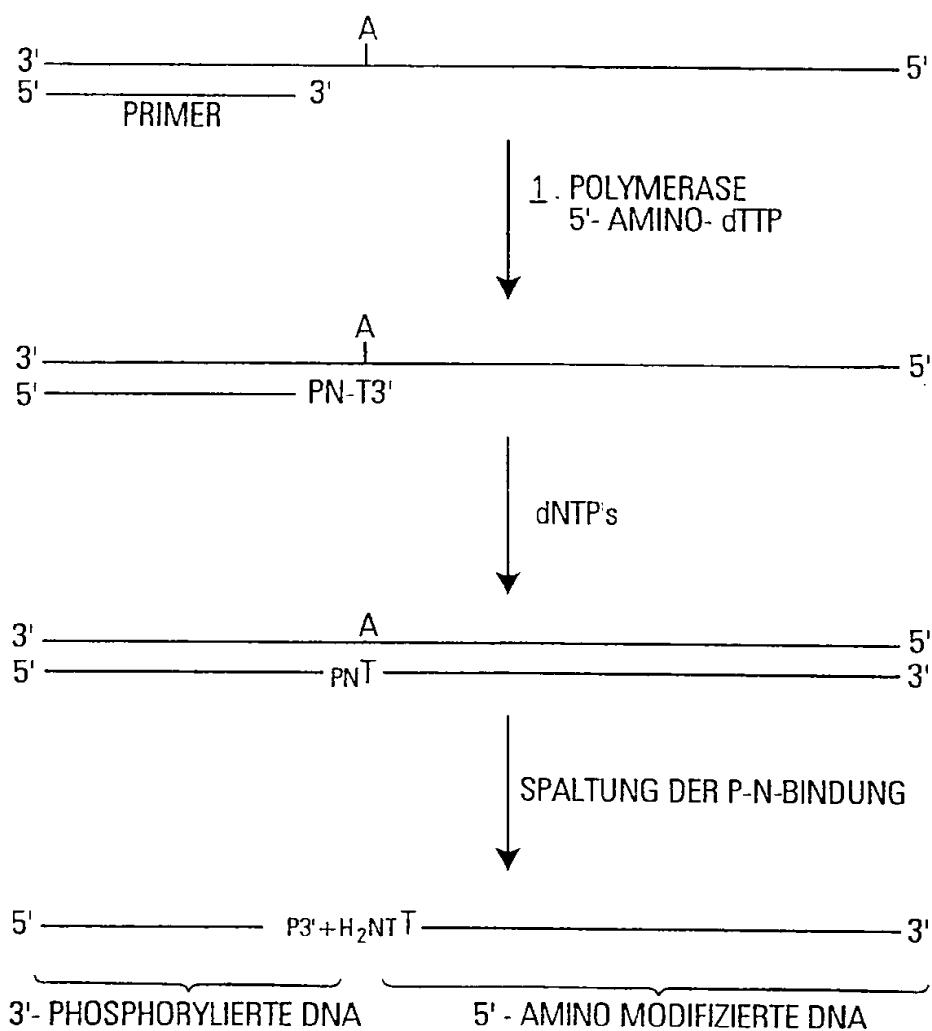
FIG.3

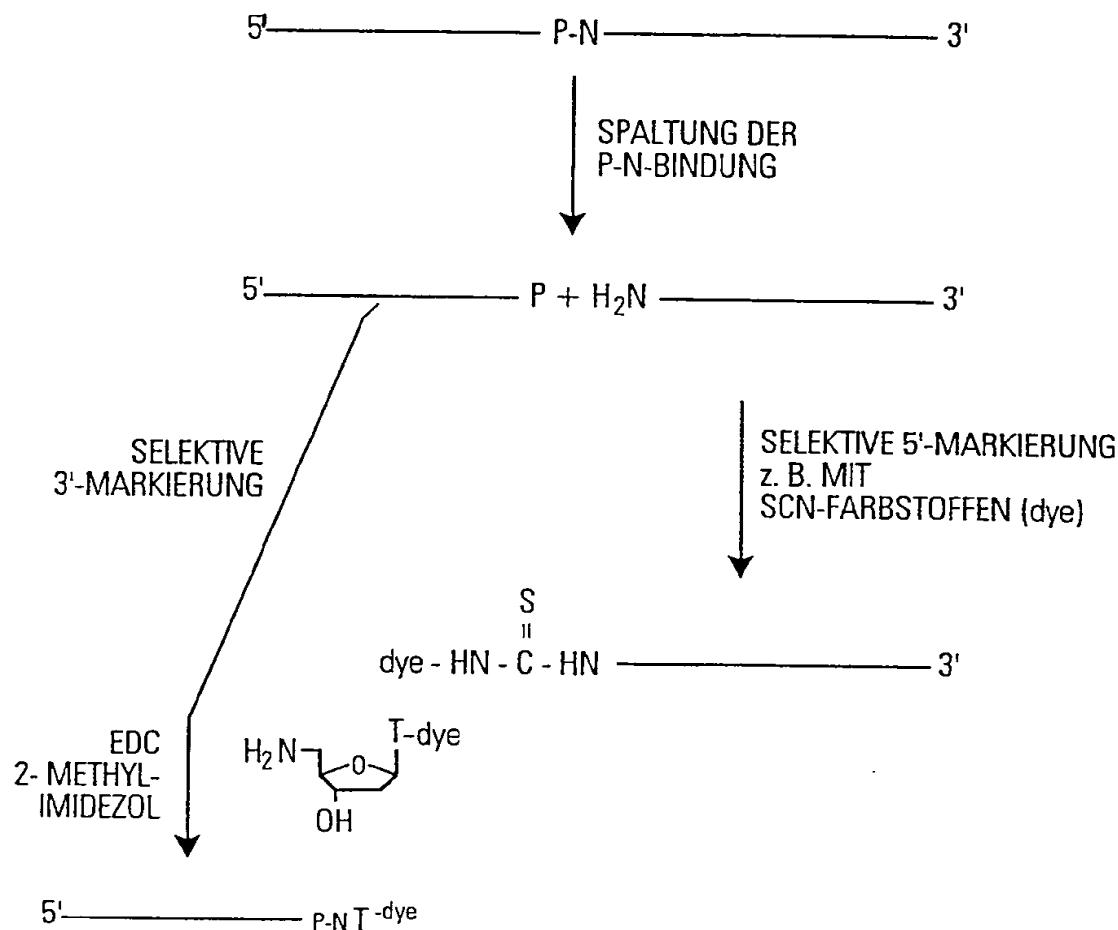
FIG.4

FIG.5

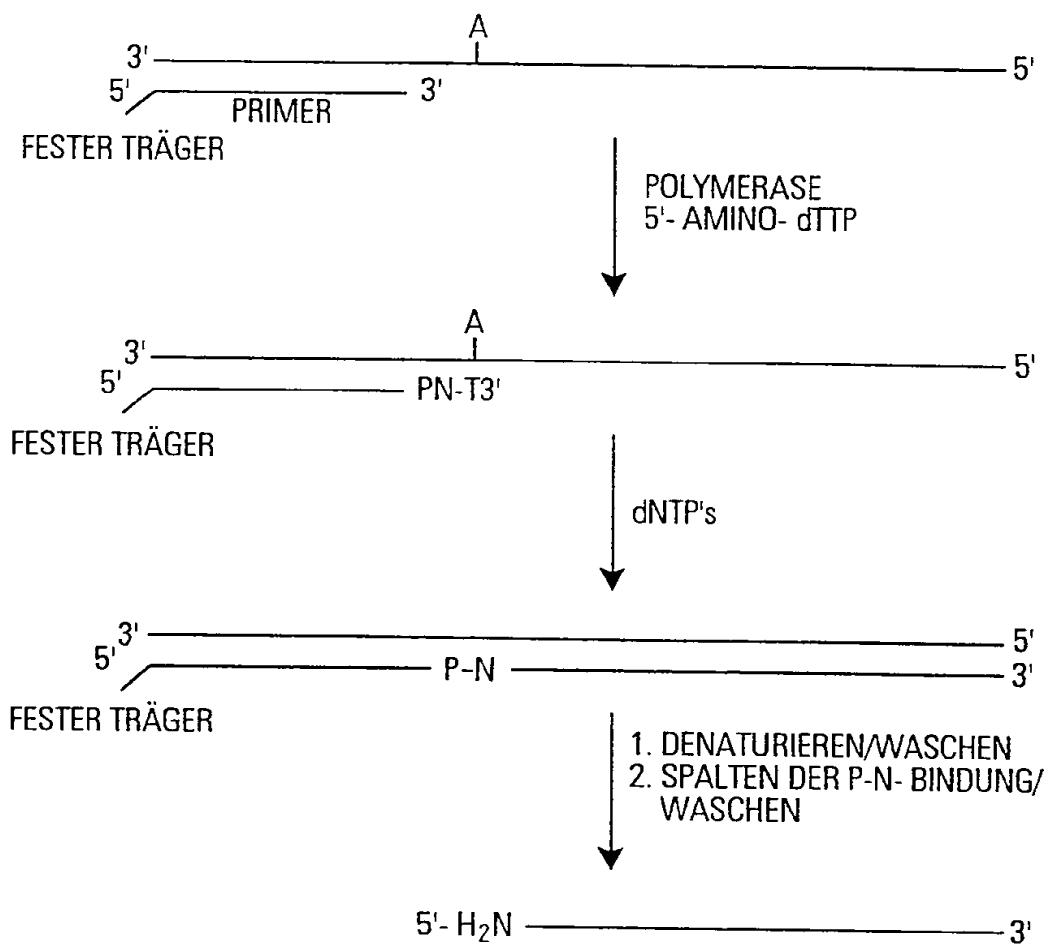


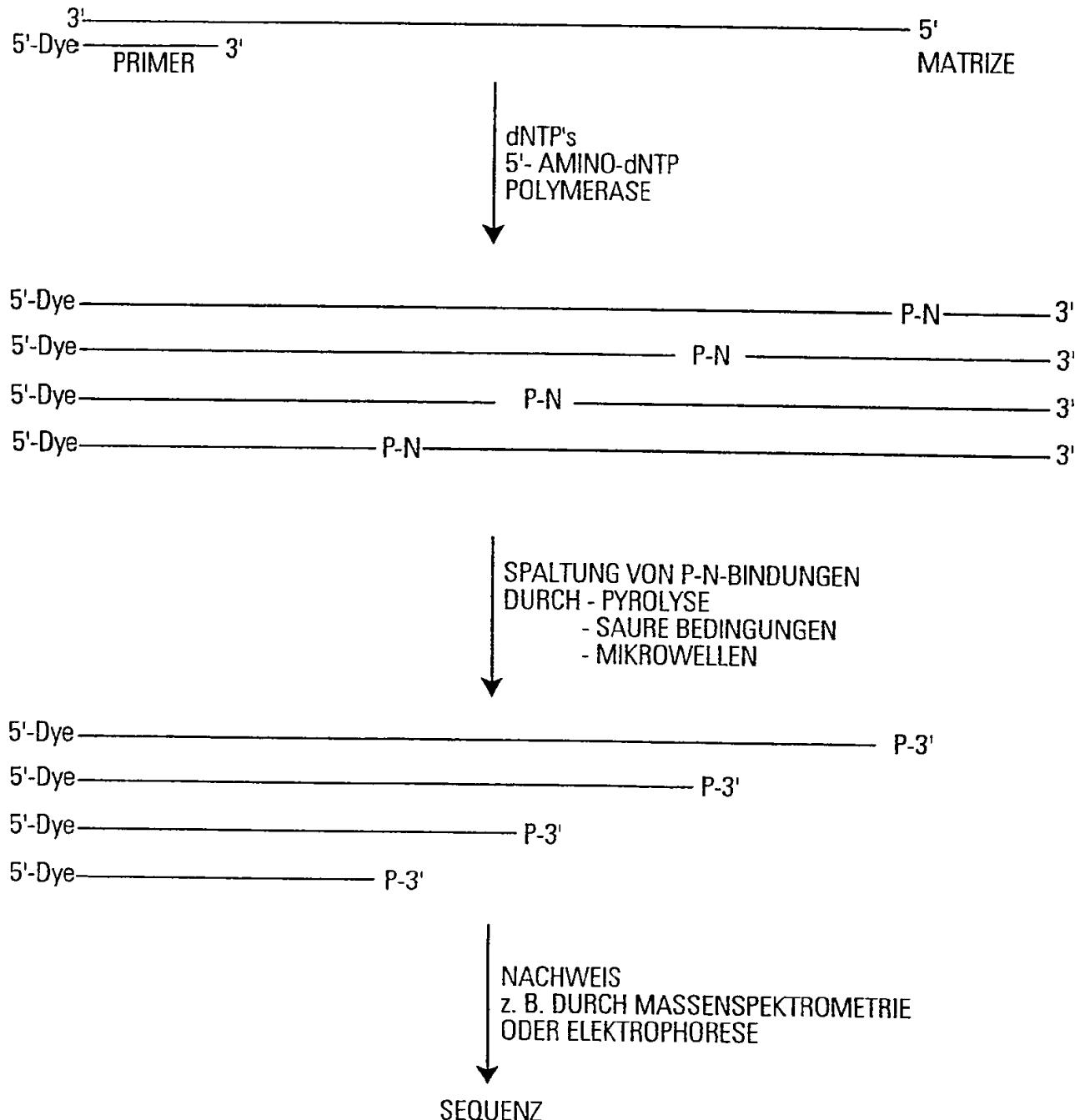
FIG.6

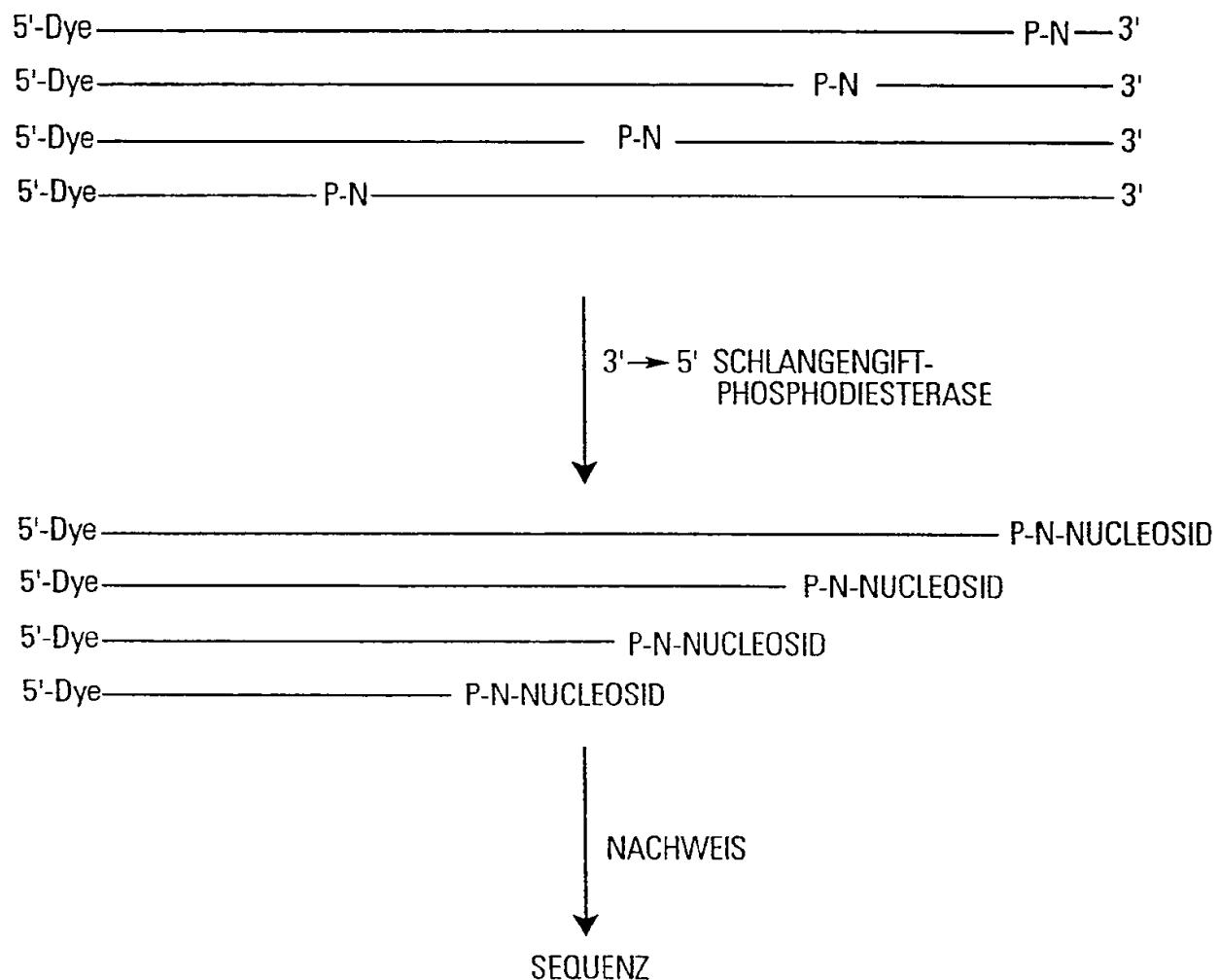
FIG.7

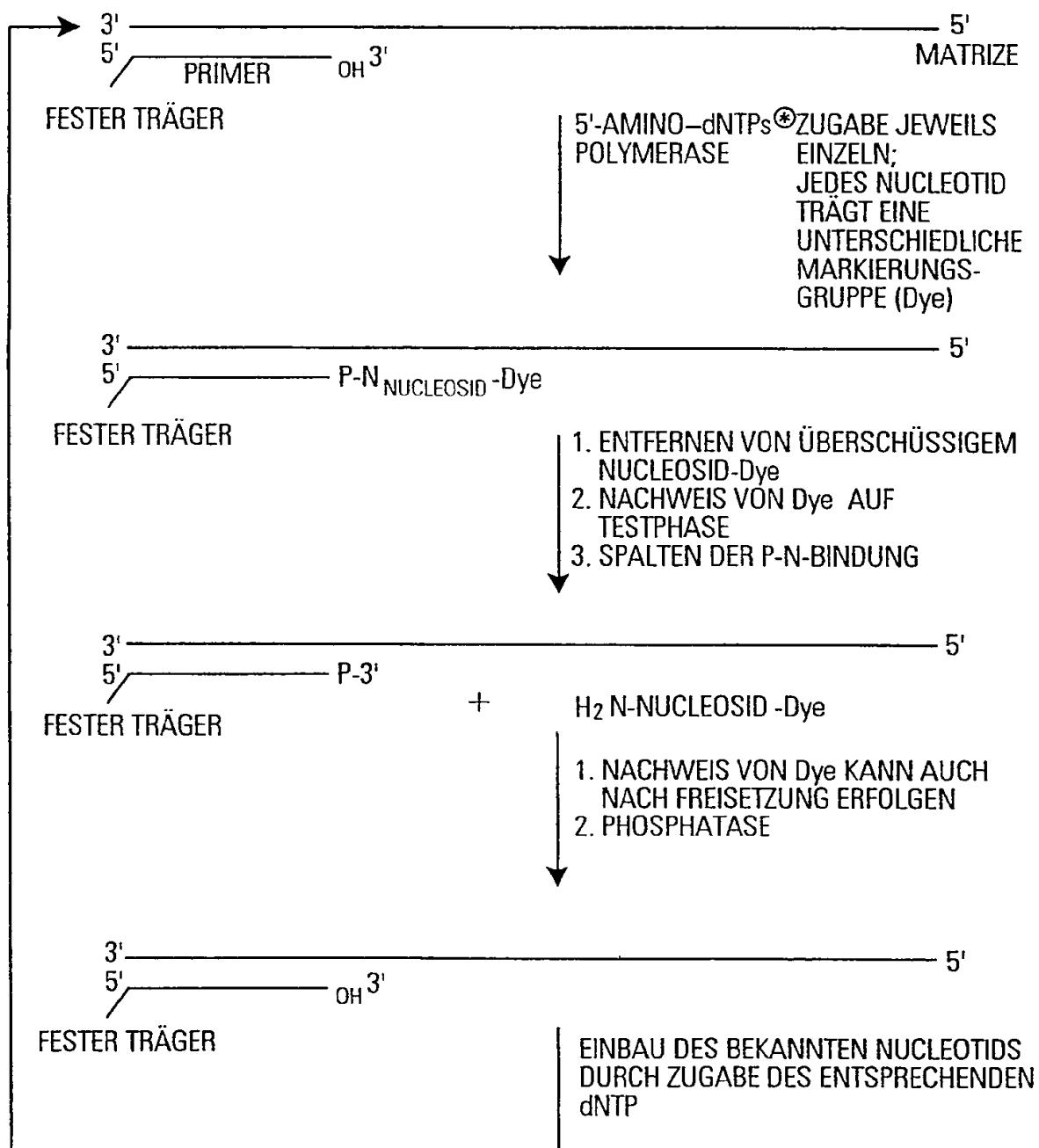
FIG.8

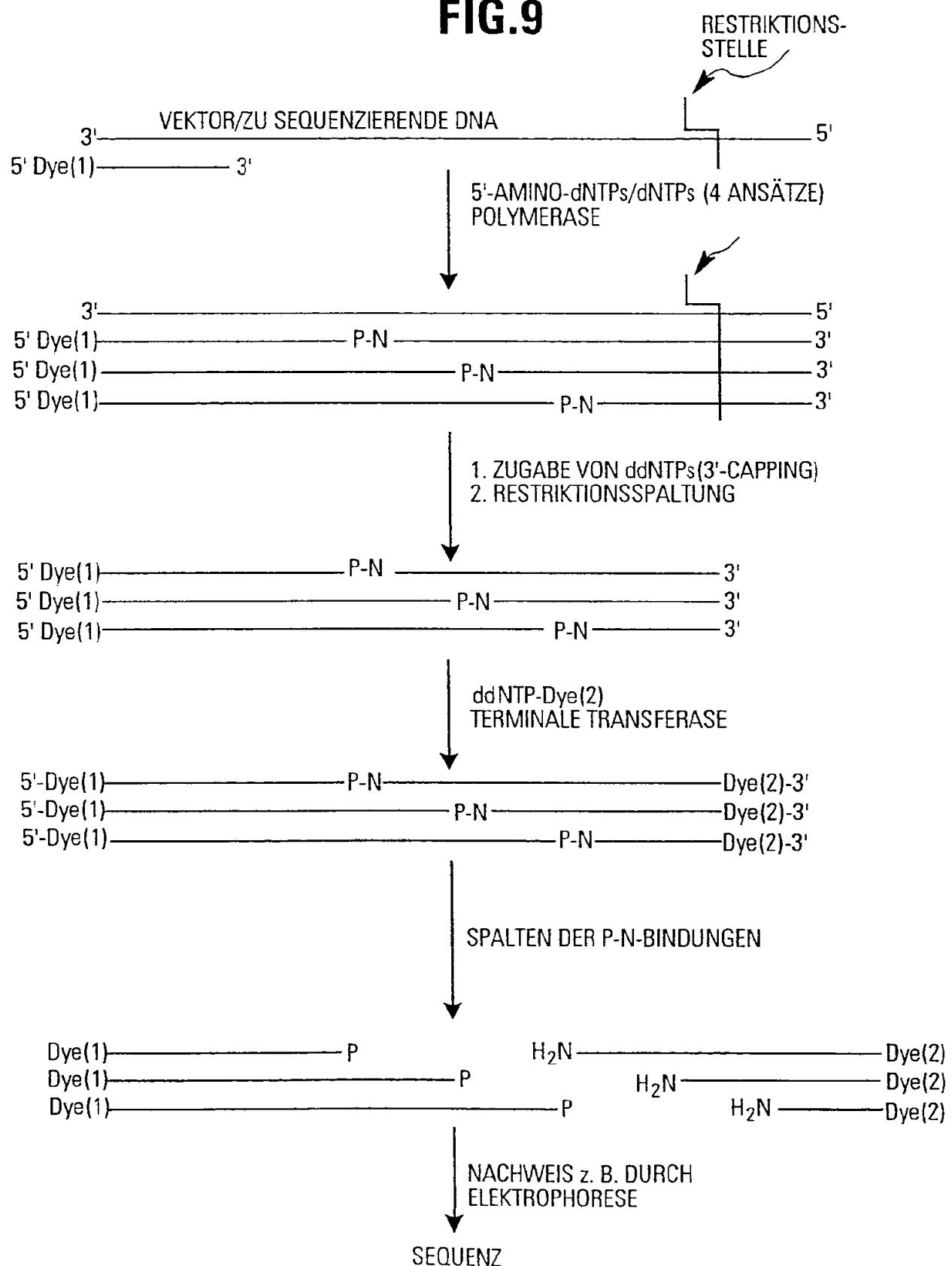
FIG.9

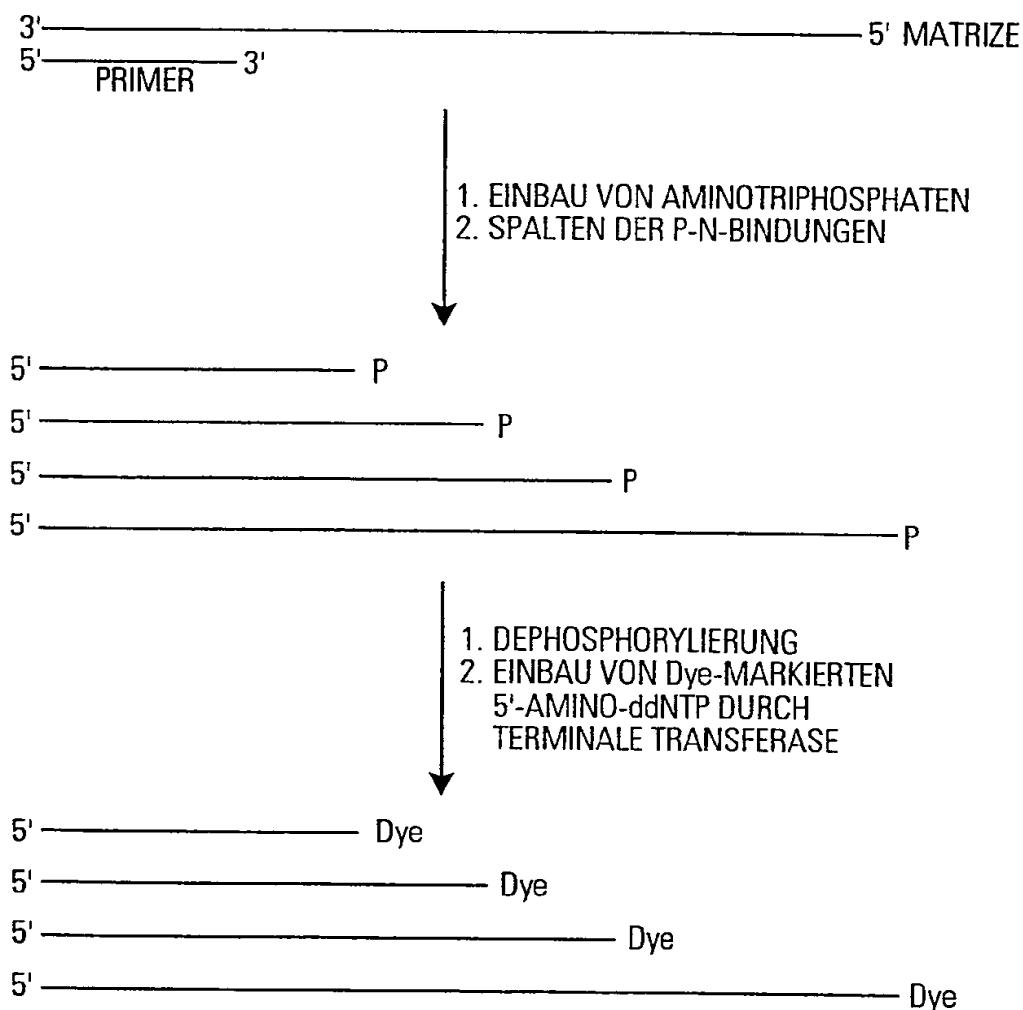
FIG.10

FIG.11

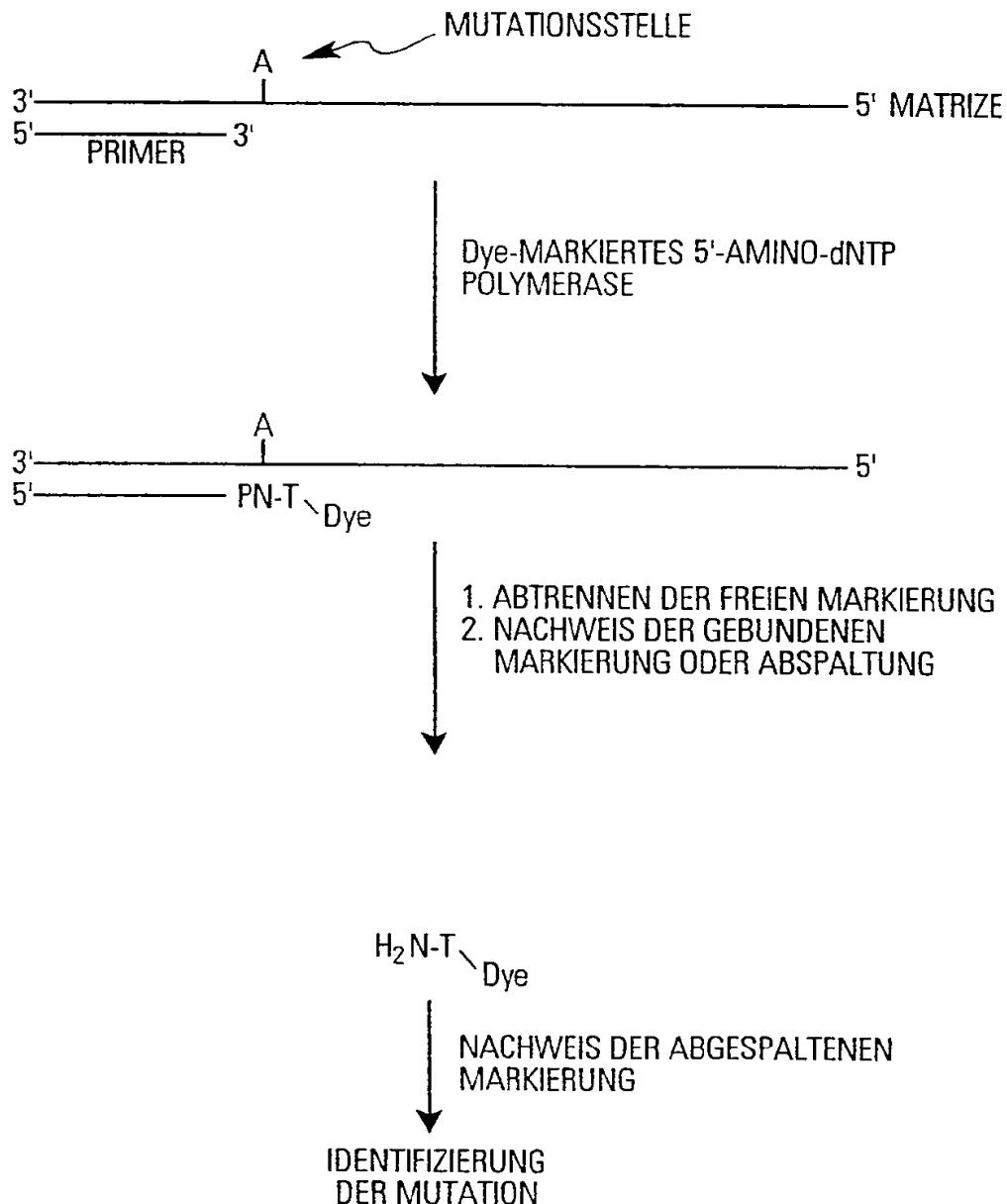


FIG.12

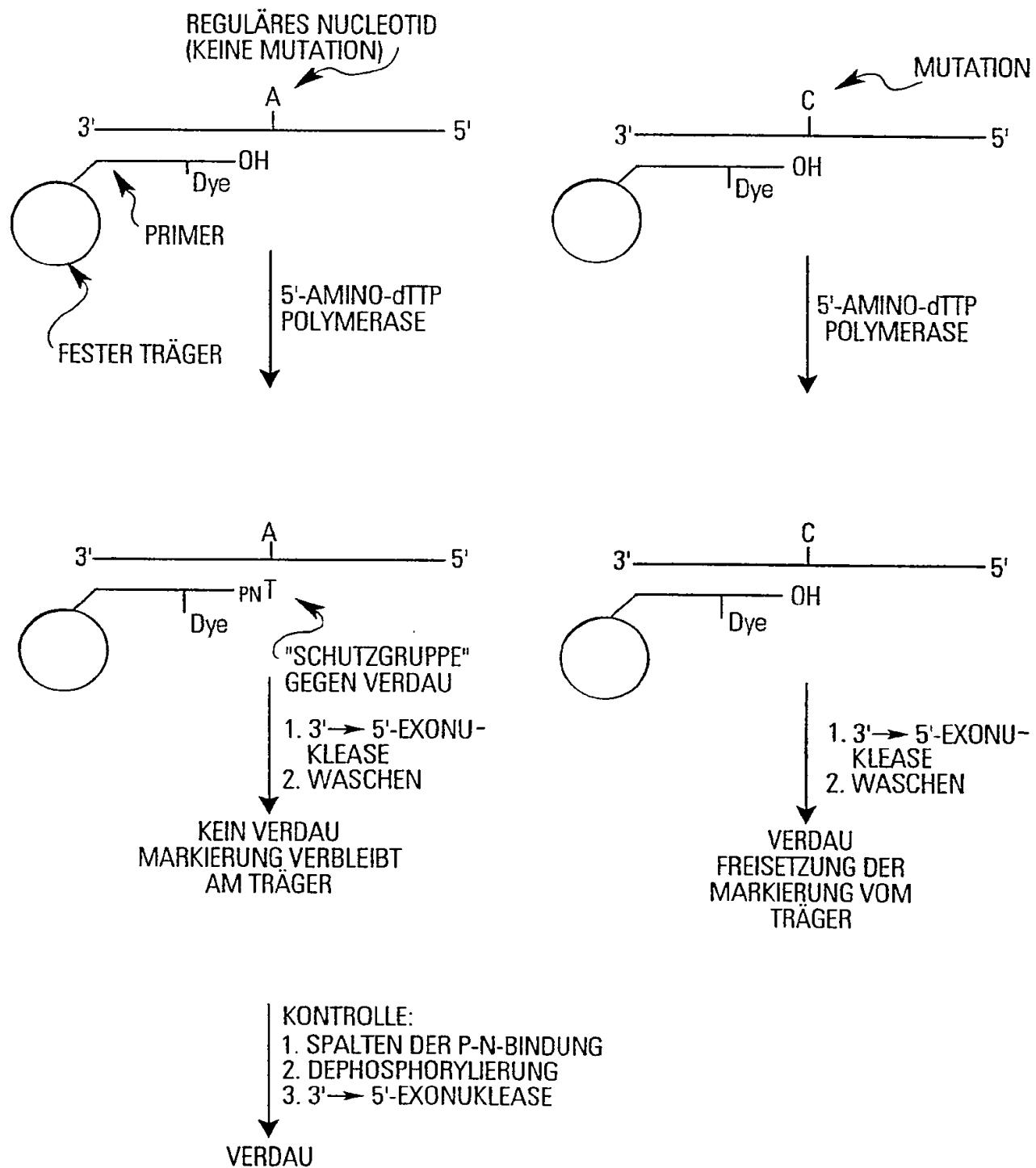


FIG.13

